

PCTВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюроМЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

BEST AVAILABLE COPY

(51) Международная классификация изобретения ⁶ : C07K 1/02, 9/00	A1	(11) Номер международной публикации: WO 97/10259 (43) Дата международной публикации: 20 марта 1997 (20.03.97)
(21) Номер международной заявки: PCT/RU96/00254 (22) Дата международной подачи: 10 сентября 1996 (10.09.96) (30) Данные о приоритете: 95115861 11 сентября 1995 (11.09.95) RU (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): БЕЗРУКОВ Михаил Васильевич [RU/RU]; 142092 Троицк, Московской обл., ул. Солнечная, д. 6, кв. 4 (RU) [BEZRUKOV, Mikhail Vasilievich, Troitsk (RU)]. (71)(72) Заявитель и изобретатель: БЕЗРУКОВА Елена Юрьевна [RU/RU]; 142092 Троицк, Московской обл., ул. Солнечная, д. 6, кв. 4 (RU) [BEZRUKOVA, Elena Yurievna, Troitsk (RU)].		(81) Указанные государства: CA, CN, JP, KR, US, европейский патент (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Опубликована С отчетом о международном поиске.
(54) Title: METHOD OF PRODUCING MURAMYL PEPTIDES (54) Название изобретения: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МУРАМИЛПЕПТИДОВ (57) Abstract <p>The present invention pertains to medicine and veterinary science, more specifically, to a method of obtaining physiologically active muramyl peptides. The proposed method involves obtaining an activated ether of an unprotected N-acetyl muramic acid of N-acetylglucosaminyl-(β1→4)-N-acetyl muramic acid, condensing it with an unprotected amino acid or peptide or salts thereof in pyridine, its homologs or mixtures thereof using organic solvents, and separation of the target product by chromatography. The proposed method facilitates production of high yields of pure muramyl peptide using synthesis procedures with few stages.</p>		

Настоящее изобретение относится к области медицины и ветеринарии, а точнее, к способу получения физиологически активных мурамилпептидов.

Способ включает получение активированного эфира незащищенной N-ацетилмурамовой кислоты или N-ацетилглюкозаминил-($\beta 1 \rightarrow 4$)-N-ацетилмурамовой кислоты, его конденсацию с незащищенной аминокислотой, пептидом или их солями в пиридине, его гомологах или в их смесях с органическими растворителями и выделение целевого продукта с использованием хроматографии.

Способ позволяет получать с высоким выходом чистые мурамилпептиды с использованием малостадийных схем синтеза.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	Австрия	FI	Финляндия	MR	Мавритания
AU	Австралия	FR	Франция	MW	Малави
BB	Барбадос	GA	Габон	NE	Нигер
BE	Бельгия	GB	Великобритания	NL	Нидерланды
BF	Буркина Фасо	GN	Гвинея	NO	Норвегия
BG	Болгария	GR	Греция	NZ	Новая Зеландия
BJ	Бенин	HU	Венгрия	PL	Польша
BR	Бразилия	IE	Ирландия	PT	Португалия
CA	Канада	IT	Италия	RO	Румыния
CF	Центральноафриканская Республика	JP	Япония	RU	Российская Федерация
BY	Беларусь	KP	Корейская Народно-Демократическая Республика	SD	Судан
CG	Конго	KR	Корейская Республика	SE	Швеция
CH	Швейцария	KZ	Казахстан	SI	Словения
CI	Кот д'Ивуар	LI	Лихтенштейн	SK	Словакия
CM	Камерун	LK	Шри Ланка	SN	Сенегал
CN	Китай	LU	Люксембург	TD	Чад
CS	Чехословакия	LV	Латвия	TG	Того
CZ	Чешская Республика	MC	Монако	UA	Украина
DE	Германия	MG	Мадагаскар	US	Соединенные Штаты Америки
DK	Дания	ML	Мали	UZ	Узбекистан
ES	Испания	MN	Монголия	VN	Вьетнам

Способ получения мурамилпептидов

Область техники

5 Настоящее изобретение относится к области медицины и ветеринарии, а точнее, к способу получения мурамилпептидов, которые являются физиологически активными соединениями, проявляющими иммуномодулирующую, противоопухо-

10

Предшествующий уровень техники

В настоящее время известно значительное количество физиологически активных мурамилпептидов. Наиболее изу-
15 ченными из них являются N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин или МДП (Kotani S. et al., Biken J., 1975, v.18, N 2, p. 105-111) и N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин или ГМДП (Ростовцева Л.А. и др., Биоорганическая химия, 1981, т. 7, N 12, с.
20 1843-1858).

В основе всех известных на сегодняшний день способов получения мурамилпептидов лежит конденсация защищенного или незащищенного производного N-ацетилмурамовой кислоты, имеющего активированную карбоксильную группу, с
25 защищенным пептидом или аминокислотой с последующим удалением защитных групп. Однако, во всех этих способах присутствует стадия деблокирования защищенного мурамилпептида каталитическим гидрированием, а также проведение конденсации активированных эфиров N-ацетилмурамовой кислоты с пептидами в таких растворителях, как диметилформид (ДМФА) или смеси ДМФА с ацетонитрилом, которые, как
30 известно способствуют рацемизации.

Известен способ получения n-бутилового эфира N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамилдипептида конденсацией
35 сацией n-бутилового эфира дипептида с пентафторфениловым эфиром N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамовой кислоты (Медерякова Е.А. и др., Биоорганическая химия

- 2 -

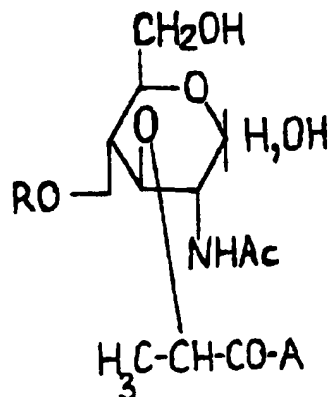
- 1991, т. 17, N 9, с. 1157-1165). Однако, этот способ не может быть использован для получения мурамилпептидов, содержащих остатки аминокислот с незащищенной карбоксильной группой вследствие крайне низкой растворимости незащищенных пептидов и их солей в ДМФА и возможности протекания при синтезе реакций О-ацилирования (Гирин С. К., Швачкин Ю.П., ЖОХ, 1983, N 12, с. 277), эпитермизации ("Пептиды. Основные методы образования пептидных связей", под ред. Э.Гросса и И. Майенхофера, М., Мир, 1983, с. 52, 341) и перэтерификации (Там же, с. 160). Протекание вышеуказанных реакций приводит к образованию микропримесей, близких по хроматографическому поведению к целевому веществу, поэтому их отделение обычными методами затруднено.
- Известен способ получения мурамилпептидов конденсацией производного N-ацетилмурамовой кислоты, активированного по карбоксильной группе реагентом Вудворда К, с защищенным дипептидом в ДМФА в присутствии органического основания с последующим деблокированием защищенного мурамилпептида каталитическим гидрированием над палладиевой чернью (Ростовцева Л.А. и др., Биоорганическая химия, 1981, т. 7, N 12, с. 1843-1858). Способ позволяет получать мурамилпептиды с выходом около 40% в расчете на углеводную компоненту. Широкому использованию способа препятствует наличие технически сложной стадии каталитического гидрирования конечного мурамилпептида, низкий выход целевого продукта и многостадийность его получения. Исходный защищенный дипептид получают в результате шестистадийного синтеза (Kiso M. et al., J. Med. Chem., 1966, v. 9, p. 971-973), а в целом синтез мурамилпептида включает 8 стадий.

- 3 -

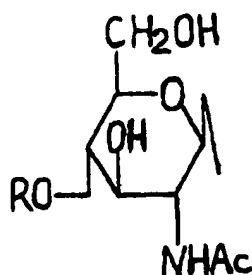
Раскрытие изобретения

В основу изобретения положена задача изменить процесс синтеза мурамилпептидов таким образом, чтобы исключить стадию деблокирования целевых продуктов, повысить их чистоту за счет уменьшения образования микропримесей, близких по хроматографическому поведению к целевым веществам, а также увеличить выход мурамилпептидов.

Задача решена тем, что в заявленном способе получения мурамилпептидов общей формулы:



где R - водород или



A - остаток аминокислоты или пептида, включающем конденсацию активированного производного N-ацетил-мурамовой кислоты с аминокислотой или пептидом или их солями с последующей хроматографической очисткой целевого продукта, согласно изобретению, конденсации подвергают неацетилированные аминокислоту или пептид или их соли, и процесс осуществ-

- 4 -

вляют в пиридине или его гомологах или в их смесях с органическими растворителями.

Согласно заявляемому изобретению в качестве исходных соединений могут быть использованы невашищенные аминокислоты, пептиды и их соли со свободными карбоксильными, окси- и амидными группами.

В качестве активированных производных N-ацетилмурамовой кислоты и ее производных применяют активированные эфиры, для получения которых используют дивалентные карбонаты: дипентафторфенилкарбонат, динитрофенилкарбонаты, ди(2,3,5,6-тетрафторфенил)карбонат, ди(N-сукцинимидил)карбонат, ди(N-фталимидил)карбонат, ди(N-глутарамидил)-карбонат, ди(N-этоксикарбонилгидроксиламин)карбонат, ди(N-бензоилгидроксиламин)карбонат, ди(N-триметилацетилгидроксиламин)карбонат, ди(1-оксипиридон-2)карбонат, ди(8-гидроксихинолин)карбонат, ди(2,4,5-трихлорфенил)карбонат и др.

Полученный раствор активированного эфира смешивают с раствором свободного пептида или аминокислоты или соли аминокислоты или пептида в пиридине или его гомологах или в их смесях с органическими растворителями.

Описано, что при активации карбоксильной группы N-ацетилмурамовой кислоты в пиридине могут получаться сложные смеси продуктов за счет протекания реакций ацилирования и перэтерификации (Strange R.E., Dark F.A., Nature, 1963, v. 197, p. 694), однако, в нашем случае этого не происходит и получаются с высоким выходом продукты не содержащие близких по хроматографическому поведению к основному веществу примесей. В то же время, использование при получении мурамилпептидов водно-органических смесей растворителей, содержащих ДМФА, диметилсульфоксид и т.п. приводит к уменьшению выхода и снижению качества целевых продуктов вследствие гидролиза и рацемизации, протекающих даже при pH 7 - 8 и пониженных температурах.

- 5 -

Основным преимуществом способа является отсутствие технически сложной стадии каталитического гидрирования конечного мурамилпептида, что обусловлено использованием

5 в синтезе свободного пептида, аминокислоты или их солей. Рискованность гидрирования конечного мурамилпептида обусловлена как возможностью отравления катализатора компонентами исходной смеси, так и возможностью гидрирования на палладиевом катализаторе альдегидной формы N-ацетилмурамической кислоты. Оба процесса ведут к снижению выхода целевого продукта и его загрязнению.

10

Таким образом, использование в качестве растворителя пиридина или его гомологов или их смесей с органическими растворителями позволяет проводить синтез со свободными пептидами, аминокислотами или их солями без защиты функциональных групп. Кроме того, использование неочищенных пептидов и сахаров позволяет получать мурамилпептиды минуя стадию деблокирования.

15

По данным ВЭМХ полученные по заявляемому способу мурамилпептиды не содержат примесей, обусловленных побочными реакциями O-ацилирования, эимеризации и перэтерификации.

20

Согласно данному изобретению можно получать мурамилпептиды высокой степени чистоты за минимальное число стадий. Выход целевого продукта как правило превосходит 70 %, считая на углеводную компоненту.

25

Краткое описание фигур чертежей

30 Для большей ясности заявленный способ проиллюстрирован прилагаемыми чертежами:

Фиг.1 - схема синтеза ГМПП по известному способу (Ростовцева Л.А. и др., Биоорганическая химия, 1981, т.7, N 12, с. 1843-1858).

35 Фиг.2 - схема синтеза мурамилпептидов ГМПП и МПП.

Фиг.3 - схема синтеза мурамилпептидов R-MurNAc-L-Ala-D-Glu-OH (R - H или GlcNAc).

- 6 -

Фиг. 4 - аналитическая ВЖХ реакционной смеси, содержащей ГМДП, до разделения на Sephadex DEAE A-25 в ацетатной форме. Пики 1, 2, 3 и 4 - остатки органических растворителей и дипептида L-аланил-D-изоглутамин; пики 5 и 6 - аномерные формы ГМДП.

Фиг. 5 - аналитическая ВЖХ очищенного ГМДП.

10 Лучший вариант осуществления изобретения

Заявляемый способ получения мурамилпептидов осуществляют следующим образом.

15 Получение исходных пептидов осуществляют с использованием традиционных методов пептидного синтеза, в том числе, по схемам, приведенным на фиг. 1 -3. Дисахарид из биомассы *M. lysodeiolicus* получают по методике аналогичной (Millerman D., Sharon N., J. Biol. Chem., 1967, v. 242, p. 3414- 3427).

20 Получают активированный эфир N-ацетилмурамовой кислоты или ее производных и смешивают его с раствором свободного пептида или аминокислоты или соли аминокислоты или пептида в пиридине или его гомологах или в их смесях с органическими растворителями.

25 Реакцию образования мурамилпептида проводят при pH 8 -10. По завершении образования пептидной связи реакционную смесь упаривают и выделяют мурамилпептид с использованием хроматографии на Sephadex DEAE A-25 или С обращенной фазе в 1 -7 % спиртовых растворах при pH 2 -3.

30 Чистоту целевых мурамилпептидов определяют с помощью ВЖХ. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводят на С обращенной фазе на колонке 0,46 x 4,5 см в градиенте 0,1 % трифторуксусная кислота в воде ---> 20 % ацетонитрил в воде с 0,1 % трифторуксусной кислоты за 7 мин. Скорость элюции 1 мл/мин, детекция при 226 нм или в других подобных условиях. Структуру мурамилпептидов -
35 подтверждают данными масс-спектрометрии и сравнением дан-

- 7 -

ных ВЖХ и ТСХ со стандартами, полученными по методу (Ростовцева Л.А. и др., Биоорганическая химия, 1981, т. 7, N 12, с. 1843- 1858).

- 5 Использование в качестве растворителей пиридина или его гомологов или их смесей с органическими растворителями позволяет проводить синтез со свободными пептидами, аминокислотами или их солями без защиты функциональных групп.
- 10 Возможность использования в способе пептидов и аминокислот с незащищенными карбоксильными, окси- и амидными группами позволяет не только исключить стадию деблокирования целевого продукта, но и упростить получение самого целевого мурамилпептида за счет сокращения количества
- 15 стадий в его синтезе. При этом суммарное количество стадий в синтезе ГМДП (исходя из D-глутаминовой кислоты) снижается с 8 (см. фиг. 1) до 5 стадий (см. фиг. 2), а для МДП - с 5 до 3 (см. фиг. 3).

- 20 Аналогичным путем могут быть получены и другие мурамилпептиды, в том числе содержащие соединенные с D-изоглутамином или D-изоглутаминовой кислотой аминокислоты аланин, валин, серин, лейцин, треонин и др.

- 25 Для лучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры осуществления заявленного способа.

Пример 1.

- 30 Синтез N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина (ГМДП) осуществляют следующим образом: 496,5 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил (β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовой кислоты растворяют в 3 мл ДМФА, добавляют 394 мг порошка дипентафторфенилкарбоната и перемешивают при температуре 0 - +5 $^{\circ}$ C в течение 1 часа, затем добавляют 120 мкл N-метилморфолина и перемешивают еще 0,5 часа. К полученной реакционной смеси добавляют при
- 35 перемешивании при температуре 0 - +5 $^{\circ}$ C раствор 434 мг (2 ммоль) L-аланил-D-изоглутамина в 5 мл пиридина и 440 мкл

- 8 -

5 N-метилморфолина. Реакционную смесь выдерживают при $+7^{\circ}\text{C}$ в течение 17 часов. По завершении реакции растворители отгоняют в вакууме, добавляют 15 мл уксусной кислоты и повторно упаривают досуха. Реакционную смесь анализируют (аналитическая ВЖХ представлена на фиг. 4), растворяют в 15 мл воды, наносят на колонку 1,5 x 50 см с Sephadex DEAE A-25 в ацетатной форме и хроматографируют. Элюцию осуществляют водой, затем 0,04 М раствором уксусной кислоты. Фракции, содержащие ГМДП, упаривают и получают 521,8 мг (75 %) целевого продукта 98 % чистоты, что подтверждается данными ВЖХ (см. фиг. 5).

Пример 2.

Синтез ГМДП осуществляют следующим образом: 496,5 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовой кислоты растворяют в 3 мл ДМФА, добавляют 302 мг порошка ди(2- нитрофенил)карбоната, 120 мкл N-метилморфолина и оставляют перемешиваться при температуре 20°C на 17 часов, а затем упаривают при 30°C в вакууме. К полученной реакционной смеси при 20°C добавляют при перемешивании раствор 662 мг (2 ммоль) трифторацетата L-аланил -D-изоглутамина и 440 мкл N-метилморфолина в 4 мл пиридина. Реакционную смесь выдерживают при $+20^{\circ}\text{C}$ в течение 40 часов. По завершении реакции растворители отгоняют в вакууме при 45°C досуха. Реакционную смесь растворяют в воде и хроматографируют в условиях примера 1 на колонке с Sephadex DEAE A-25 в ацетатной форме. Элюцию осуществляют водой, затем 0,04 М раствором уксусной кислоты. Фракции, содержащие ГМДП, упаривают и получают 556,58 мг (80 %) целевого продукта 98 % чистоты.

Пример 3.

Синтез ГМДП осуществляют следующим образом: 496,5 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовой кислоты растворяют в 5 мл пиридина, добавляют 394 мг дипентафторфенилкарбоната и 120 мкл N-метилморфолина и оставляют перемешиваться при температуре 10°C на 17 ча-

- 9 -

сов. К полученной реакционной смеси добавляют 496,5 мг трифторацетата L-аланил-D-изоглутамина и 480 мкл N-метилморфолина в 4 мл пиридина. Реакционную смесь выдерживают при +10°C в течение 17 часов, затем упаривают досуха. Добавляют 30 мл 50 % уксусной кислоты и упаривают досуха повторно. Полученный препарат хроматографируют в условиях примера 1, фракции, содержащие ГМДП, упаривают и получают 591,4 мг (85 %) целевого продукта 98 % чистоты.

10 Пример 4.

Синтез МДП осуществляют следующим образом: 293,3 мг (1 ммоль) N-ацетилмурамовой кислоты растворяют в 4 мл ДМФА, охлаждают до +5°C, добавляют при перемешивании 394 мг (1 ммоль) дипентафторфенилкарбоната, перемешивают 1 час, затем добавляют 110 мкл триэтиламина и перемешивают в течение 0,5 часа. Далее синтез и выделение проводят аналогично примеру 1. Фракции, содержащие МДП, упаривают и получают 394 мг (80 %) целевого продукта 97 % чистоты.

Пример 5.

20 Синтез N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовой кислоты осуществляют следующим образом: 496,5 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовой кислоты растворяют в 3 мл ДМФА, добавляют 256 мг ди(N-сукцинимидил)карбоната, 120 мкл N-метилморфолина и оставляют перемешиваться в течение 6 часов при температуре 20°C, а затем упаривают в вакууме при 40°C. К полученной реакционной смеси при 20°C добавляют при перемешивании раствор 498 мг трифторацетата L-аланил-D-глутаминовой кислоты и 360 мкл N-метилморфолина в 10 мл 2-пиколоина. Реакционную смесь оставляют перемешиваться при 20°C на 19 часов, упаривают, затем переупаривают с 20 мл 50 % уксусной кислоты и хроматографируют на колонке 1,5 x 50 см с Sephadex DEAE A-25 в 0,15 М уксусной кислоте. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривают и получают 518 мг (73 %) целевого продукта 97 % чистоты.

- 10 -

Пример 6.

Синтез N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамил-L-аланина осуществляют в условиях примера 3, исходя из
5 раствора 100 мг L-аланина в 5 мл пиридина и 180 мкл N-метилморфолина. Получают 397 мг (70 %) целевого продукта 97 % чистоты.

Пример 7.

Синтез ГМДП осуществляют следующим образом: 496,5
10 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил- (β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмура-
мовой кислоты растворяют в 3 мл ДМФА, добавляют 256 мг
ди(N-сукцинимидил)карбоната, 120 мкл N-метилморфолина и
оставляют перемешиваться в течение 4 часов при 20°C. После
упаривания к полученной реакционной смеси добавляют
15 400 мг трифторацетата L-аланил-D-ивоглутамина, растворен-
ного в 6 мл пиридина, и добавляют 480 мкл N-метилморфоли-
на. Реакционную смесь выдерживают при +20°C в течение 17
часов, затем упаривают досуха. Полученный препарат хрома-
тографируют в условиях примера 1, фракции, содержащие
20 ГМДП, упаривают и получают 556,6 мг (80 %) целевого про-
дукта 97 % чистоты.

Пример 8.

Синтез N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамил-
L-аланил-D-глутаминовой кислоты осуществляют аналогично
25 примеру 5, но для растворения 400 мг L-аланил-D- глутами-
новой кислоты используют 10 мл смеси пиридин : 3- пиколин
3:1 и 300 мкл N-метилморфолина. Получают 496 мг целевого
продукта 97 % чистоты.

Пример 9.

Синтез ГМДП осуществляют аналогично примеру 1 за
30 исключением того, что исходят из раствора 496,5 мг (1
ммоль) N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамовой кис-
лоты в 5 мл смеси диметилформамид:диметилацетамид 4 : 1.
Получают 500 мг (72 %) ГМДП 97 % чистоты.

35 Пример 10.

Синтез ГМДП осуществляют аналогично примеру 7 за
исключением того, что полученный раствор N-оксисукцини-

- 11 -

мидного эфира дисахарида в 3 мл ДМФА смешивают с раствором 325,5 мг (1,5 ммоль) L-аланил-D-изоглутамина в 6 мл 20 % пиридина в воде при +5°C и выдерживают при этой температуре 17 часов. Получают 417,5 (60 %) ГМДП 97 % чистоты.

Пример 11.

Синтез ГМДП осуществляют следующим образом: 496,5 мг (1 ммоль) N-ацетилглюкозаминил- (β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмуравовой кислоты растворяют в 3 мл ДМФА, добавляют 256 мг ди(N-сукцинимидил)карбоната, 120 мкл N-метилморфолина и оставляют перемешиваться в течение 17 часов при +4°C. После упаривания к полученной реакционной смеси добавляют 400 мг трифторацетата L-аланил-D-изоглутамина, растворенного в 6 мл пиридина, и добавляют 480 мкл N-метилморфолина. Реакционную смесь выдерживают при -5°C в течение 48 часов, затем упаривают досуха. Полученный препарат хроматографируют в условиях примера 1, фракции, содержащие ГМДП, упаривают и получают 556,6 мг (80 %) целевого продукта 97 % чистоты.

Пример 12.

Синтез ГМДП осуществляют аналогично примеру 7. Выделение целевого продукта осуществляют хроматографией на колонке 5,0 x 20 см с LiChrosorb C₁₈ с применением изократического элюирования 1 % этанолом с 0,5 % уксусной кислоты при скорости элюции 20 мл/мин. Фракции, содержащие ГМДП, упаривают и получают 487 мг (70 %) целевого продукта 97 % чистоты.

30

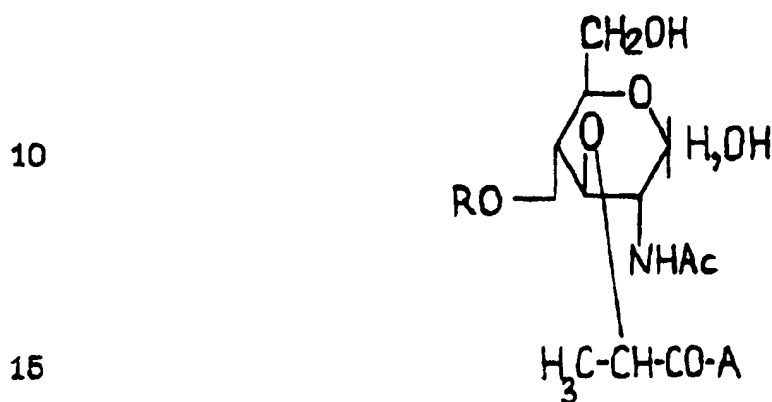
Промышленная применимость

Заявленное изобретение может найти применение в медицине и ветеринарии для получения мурамилпептидов с широким спектром физиологической активности.

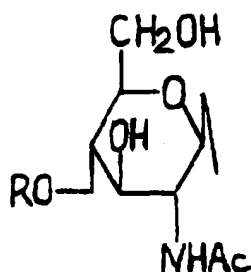
- 12 -

Формула изобретения

5 Способ получения мурамилпептидов общей формулы:

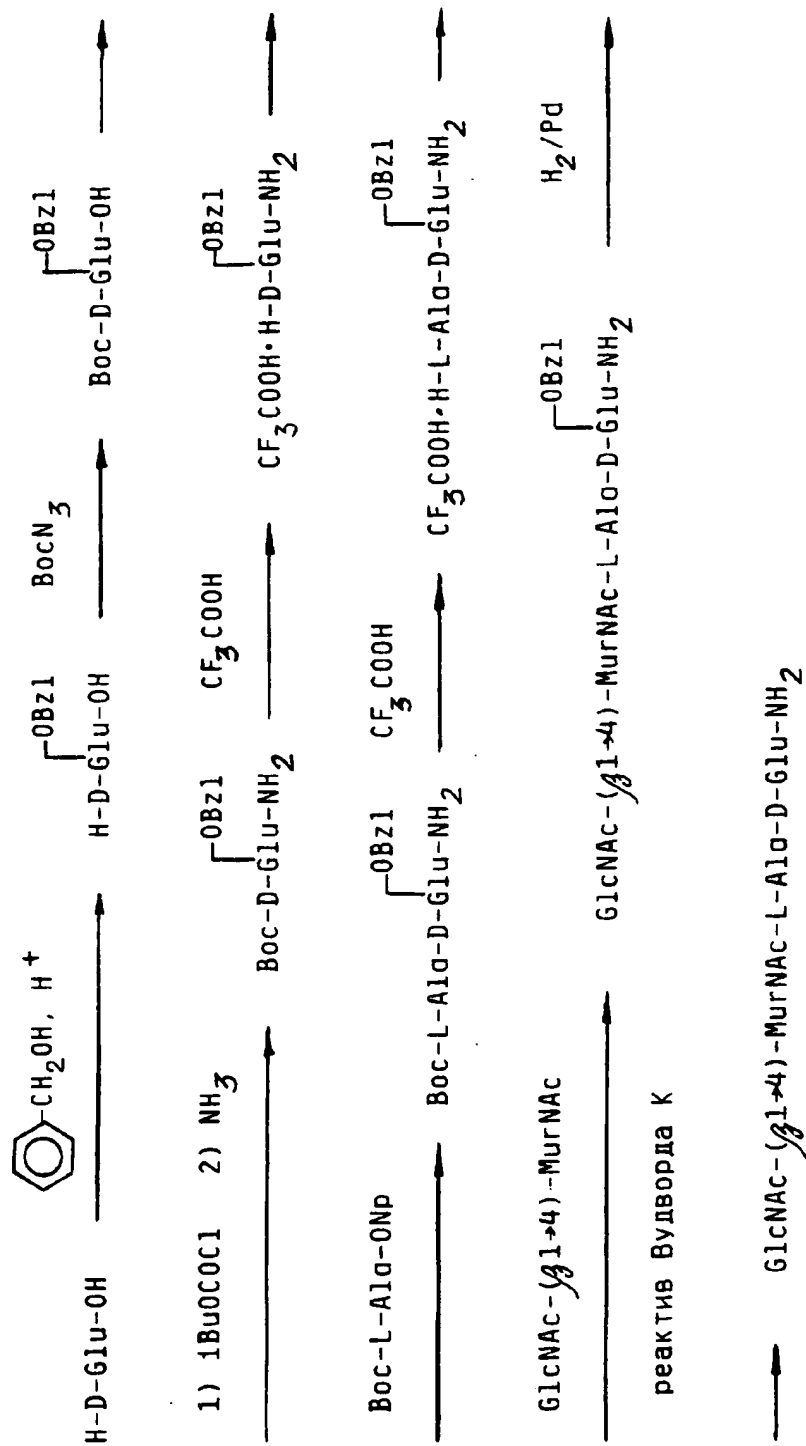


20 где R - водород или



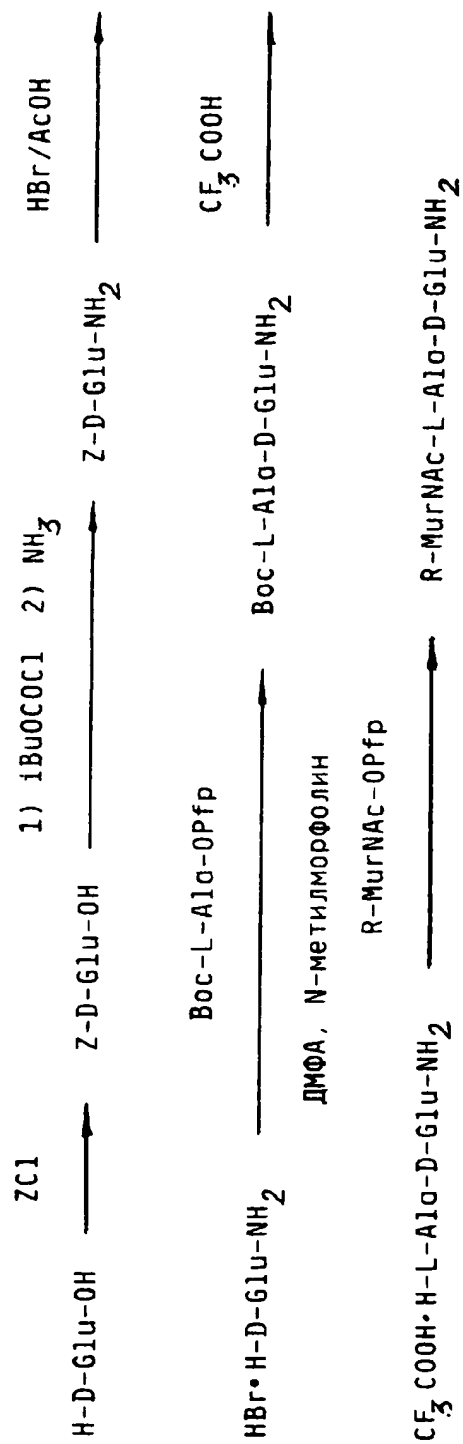
25 A - остаток аминокислоты или пептида,
 путем конденсации активированного производного N-ацетил-
 мурамовой кислоты с аминокислотой или пептидом или их со-
 лями с последующей хроматографической очисткой целевого
 продукта, отличающийся тем, что конденсации подвергают
 30 неацетилированные аминокислоту или пептид или их соли, и про-
 цесс осуществляют в пиридине или его гомологах или в их
 смеси с органическими растворителями.

1/4

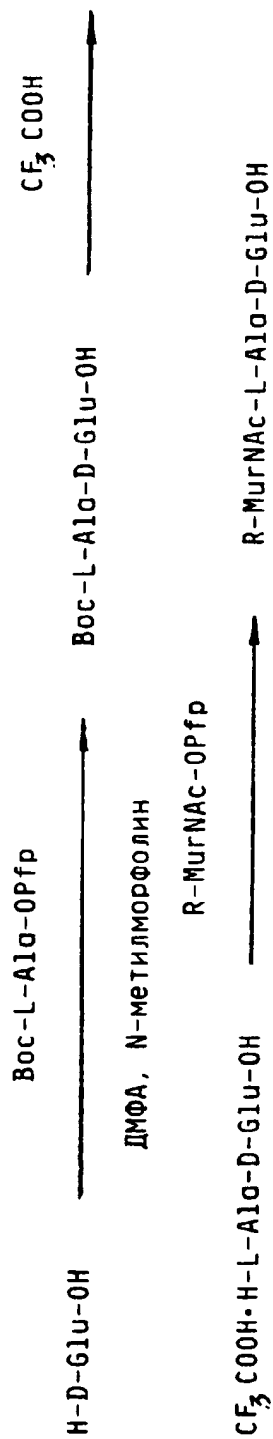


Фиг. 1

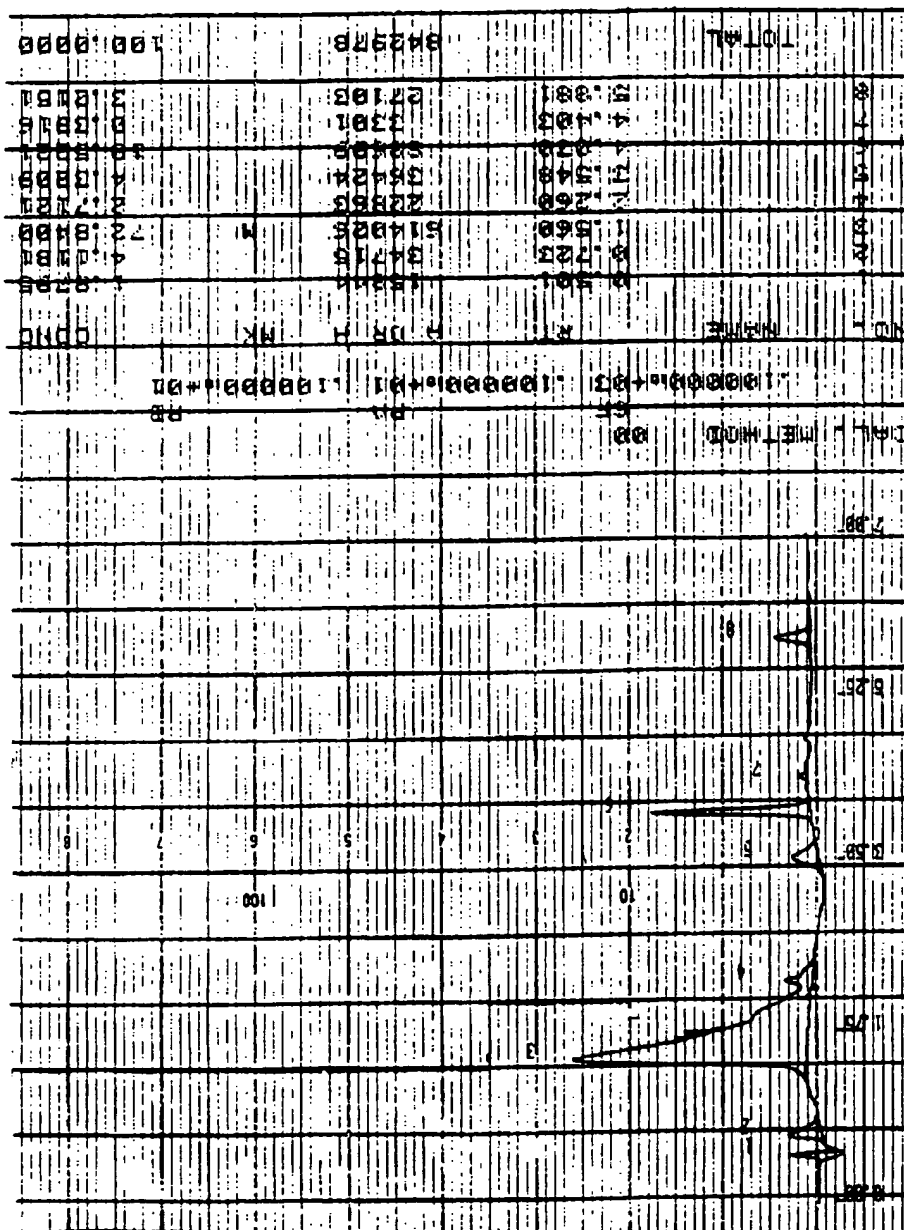
2/4



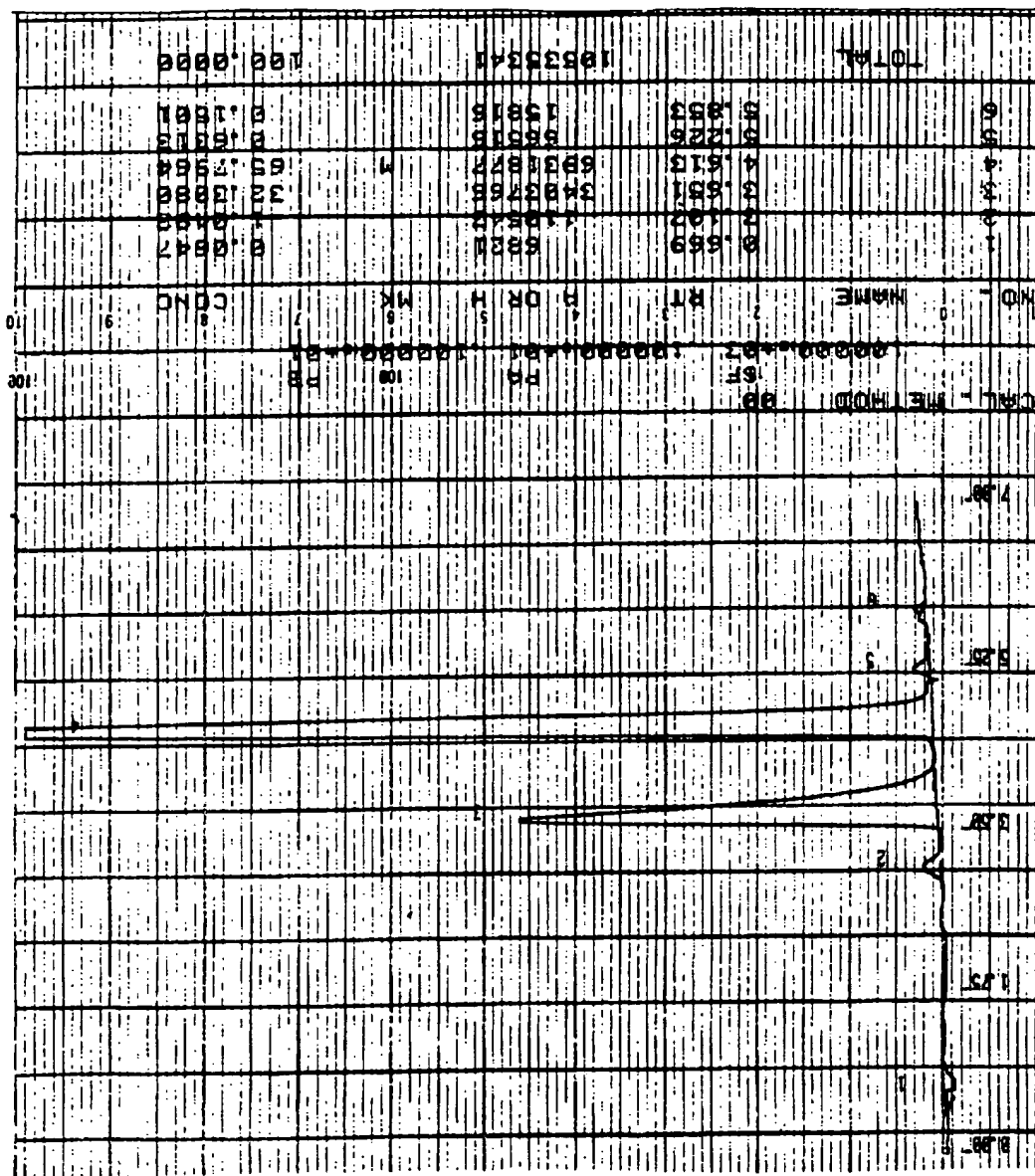
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 96/00254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ : C07K 1/02, 9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶ : C07K 1/00, 1/02, 9/00, C07H 15/00, A61K 38/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SU, A1, 1558927(SIMFEROPOLSKY GOSUDARSTVENNY UNIVERSITET), 23 April 1990 (23.04.90) ---	1
A	SU, A, 727647 (INSTITUT BIOORGANICHESKOI KHIMII), 18 April 1980 (18.04.80) ---	1
A	US, A, 4606857 (DAIICHI SEIYAKU CO.,LTD.), 19 August 1986 (19.08.86) ---	1
A	EP, A1, 0118364 (MERCK & CO.INC.), 12 September 1984 (12.09.84) ---	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1996 (19.11.96)

Date of mailing of the international search report

24 December 1996 (24.12.96)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 96/00254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR, A1, 2368282 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (A N V A R)), 19 May 1978 (19.05.78) <div style="text-align: center;"> --- ----- </div>	1

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 96/00254

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:</p> <p style="text-align: right;">C07K 1/02, 9/00</p> <p>Согласно международной патентной классификации (МПК-6)</p>		
<p>В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-6</p> <p style="text-align: right;">C07K 1/00, 1/02, 9/00, C07H 15/00, A61K 38/14</p>		
<p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:</p>		
<p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):</p>		
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ</p>		
Категория	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №:
A	SU, A1, 1558927 (СИМФЕРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ), 23 апреля 1990 (23.04.90)	1
A	SU, A, 727647 (ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ), 18 апреля 1980 (18.04.80)	1
A	US, A, 4606857 (DAIICHI SEIYAKU CO., LTD.), 19 августа 1986 (19.08.86)	1
A	EP, A1, 0118364 (MERCK & CO. INC.), 12 сентября 1984 (12.09.84)	1
A	FR, A1, 2368282 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (A N V A R)), 19 мая 1978 (19.05.78)	1

последующие документы указаны в продолжении графы С. — данные о патентах-аналогах указаны в приложении

<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники</p> <p>"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее</p> <p>"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.</p> <p>"Р" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>		<p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения</p> <p>"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень</p> <p>"У" документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории</p> <p>"&" документ, являющийся патентом-аналогом</p>	
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: right;">19 ноября 1996 (19.11.96)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: right;">24 декабря 1996 (24.12.96)</p>	
<p>Наименование и адрес Международного поискового органа:</p> <p style="text-align: center;">Всероссийский научно-исследовательский институт государственной патентной экспертизы, Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1</p> <p>Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА</p>		<p>Уполномоченное лицо:</p> <p style="text-align: right;">В.Волкова</p> <p>Телефон №: (095)240-5888</p>	

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (июль 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.